

## 明 細 書

インディアン ヘッジホッグ遺伝子導入によるヒト不死化骨髄ストローマ細胞の  
造血支持能の増強方法

## 技術分野

本発明は、造血系細胞の増殖に係る技術分野に属する。本発明は、特に、ヒト造血幹細胞又は臍帯血由来のCD34陽性細胞の増殖の技術分野、更に、具体的には、ヒト不死化骨髄ストローマ細胞の造血支持能の増強方法の技術分野に属する。

## 背景技術

近年、ヒト造血幹細胞を用いた再生医療が注目され、骨髄移植のみならず血管、心筋、肝臓などの組織再生に利用しうる可能性が示唆されている。しかしながら造血細胞中に含まれる造血幹細胞は極めて低頻度であることが、幅広い臨床応用に向けての妨げの一因となっており、多量の造血幹細胞を組織再生に利用できれば、効果的な治療法の開発につながることを期待される。これまで過去10年以上にわたり、造血幹細胞を体外で増幅させようとする多数の試みがなされてきた。それらの知見より、造血幹細胞の自己複製能と多分化能を維持する上でストローマ細胞（骨髄間質細胞）の機能が重要な役割を演ずることが明らかにされた。

例えば、マウス、ブタおよび猿の骨髄間質細胞を用いて造血幹細胞を増幅しようとする試みがなされてきた。しかしながら、異種動物のストローマ細胞を用いた場合には、異種の抗原が混入するリスクがあり、臨床応用は容易ではなかった。

最近、初代ヒト・ストローマ細胞を用いることで、無血清培地でヒト造血前駆細胞が増幅可能であることが報告された。しかしながら、初代ヒト・ストローマ細胞は長期継代が困難で、約20継代で増殖が停止し、老化してしまうといった問題点があった（非特許文献1）。

発明者等は、既に、初代ヒト・ストローマ細胞は長期継代するため、ヒト骨髄ストローマ細胞に対して様々な不死化法を試みた結果、テロメラーゼ遺伝子

(hTERT) を発現するレトロウイルスベクターを導入するのみで約 100 継代・500 日以上にわたって腫瘍化することなく長期培養可能であることを明らかにした。さらに hTERT ストローマとヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と共培養することで、CD34 陽性の造血前駆細胞を 2 週間で約 500 倍に増幅可能であり、その後もストローマに潜り込んだ造血細胞から毎週約 500 倍の造血前駆細胞が産生できることを明らかにした（特許文献 1）。

ところで、胎生期には造血幹細胞が出現し、出生までに急激に増幅することが知られている。最近、その分子メカニズムの一部が明らかにされてきた。Dyer-MA らはインディアン ヘッジホッグが胎生期の原始外胚葉に作用すると、造血および血管新生が誘導されることを報告した（非特許文献 2）。また、胎生期の神経分化に係わるソニック・ヘッジホッグが CD34 陽性造血幹細胞を増幅することを報告されている（非特許文献 3）。

なお、ヘッジホッグ遺伝子ファミリーは、細胞内シグナルとして働く分泌性タンパク質のクラスをコードしており、脊椎動物では、ヘッジホッグ遺伝子としては、ソニック (sonic)、インディアン (indian)、及びデザート (desert) が知られている。ヘッジホッグ遺伝子は、進化上保存されており、種々の動物で、正常な成長及びパターンニングを制御している。脊椎動物では、ヘッジホッグ遺伝子ホモログは、組織特異的に発現し、神経管、骨格など種々の器官の形態形成に重要な役割を負っている。当該タンパク質の活性シグナル（伝達）型は全長の Hh の自己分解中にコレステロールに結合され、この修飾が当該タンパク質の組織内での濃度勾配を形成させ、組織の立体構築に関与している。

特許文献 1 WO 03/038076 号公報

非特許文献 1 Experimental Hematology 29, 174-182

非特許文献 2 Development. 2002;129:361-372

非特許文献 3 Mech Dev. 2001;106:107-117

## 発明の開示

発明者等の樹立した hTERT ストローマ細胞は凍結保存しても造血支持能が維持され、かつドナーによらずに樹立可能であることから、自己ストローマ細胞を用

いて自己の造血前駆・幹細胞を必要なときに増幅することが可能となった。

しかしながら hTERT ストローマ細胞は、4 週以上の長期にわたり造血幹細胞の機能を維持可能である反面、幹細胞の増幅率はマウスのものと比較して低率であることが明らかとなり、造血幹細胞を増幅するための何らかの工夫が必要と考えられた。

そこで本発明者等は、hTERT ストローマ細胞にレトロウイルスベクター用いインディアン ヘッジホッグ（以下 ihh と呼ぶ）遺伝子を導入することで、インディアン ヘッジホッグを過剰発現する hTERT ストローマ細胞 (indian hedgehog/hTERT ストローマ) を樹立し、そのストローマ細胞をヒト CD34 陽性細胞と共培養したところ、コントロールのストローマと比較し CD34 陽性細胞を 3.6 倍、CFU-mix (Colony-Forming Units mixed cells、幼若コロニー形成細胞) を 5.5 倍、HPP-CFC (Highly Proliferative Potential-Colony Forming Cell、高増殖能維持コロニー形成細胞) を 8.9 倍以上に増幅し、かつ増幅された血球は強力骨髄再建することを見出し、本発明を完成させたものである。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-373173 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、A：インディアン ヘッジホッグ及びそのリセプター分子をコードする mRNA の発現を示す。プライマーは、ihh の C 末に特異的なプライマー（表 1）が用いられた。レーン 1；HUVEC、2；初代ストローマ細胞、3；hTERT ストローマ細胞、4；臍帯血、5；H<sub>2</sub>O B：Shh（ソニックヘッジホッグ）mRNA の発現を示す 表 1 の Shh-1 のプライマーセットで R T - P C R された。レーン 1；HUVEC、2；初代ストローマ細胞、3；hTERT ストローマ細胞、4；臍帯血、5；胸腺、6；H<sub>2</sub>O C：臍帯血中でのヘッジホッグレセプター分子の mRNA の発現を示す。レーン 1；全臍帯血、レーン 2；CD 3 4 陽性 R T 陽性細胞、レーン 3；CD 3 4 陽性 R T 陰性細胞（R T 反応省略したコントロール）

図 2 は、A：レトロウイルスベクター。LTR ロングターミナルリピート (long terminal repeat)、 $\Psi$  パッケージングシグナル (packaging signal)、hrGFP ヒ

ト化レニラレニフォルミス緑色蛍光タンパク質 (humanized Renillareniformis green fluorescent protein)、 IRES (internal ribosome entry originated from EMCV viral configuration) コントロールとしては、空のベクターが用いられた。B : Aに示されるベクター両者をストローマ細胞に導入したコントロールストローマ細胞と *ihh* ストローマ細胞のメイーギムザ染色を示す。 C : SH2, SH3 及び GFP の *ihh*-ストローマ細胞での発現を示す。 D : *ihh*-N 及び *ihh*-C に特異的な RT-PCR による *ihh* の mRNA 発現の分析 レーン1 はコントロールストローマ細胞、レーン2 は *ihh*-ストローマ細胞、レーン3 は、 $H_2O$  による陰性コントロールを示す。 E : ヒトストローマ細胞上清中の *ihh*-N のイムノブロット分析 *Ihh*-N は抗ヘッジホッグ 5E1 抗体でラベルされた。レーン1 はコントロールのストローマ細胞、レーン2 は、*ihh*-ストローマ細胞を表す。

図3は、(A) コントロールのストローマ細胞又は (B) *ihh* 導入ストローマ細胞で臍帯血由来 CD34 陽性細胞を2週間増幅した後生じた幼弱造血細胞 (primitive HPCs) 上の表面抗原の発現を示す。 (A) hTERT ストローマ細胞又は (B) *ihh* ストローマ細胞で臍帯血由来 CD34 陽性細胞を2週間増幅した後生じた幼弱造血細胞 (primitive HPCs) 上の表面抗原の発現を示す。 X軸は、FITC-結合モノクローナル抗体でラベルされた CD34 の発現を示す。 Y軸は、PE-結合モノクローナル抗体でラベルされた CD3、CD19、GPA、CD11b 又は CD41 の発現を示す。表面抗原への陽性は、アイソタイプのコントロールモノクローナル抗体との比較で決定した。類似の結果を示す4つの実験の内の代表的な1つの実験からのデータが示されている。

図4は、ストローマ細胞なしの状態での 5E1 モノクローナル抗体による *ihh* の阻害実験を示す。増幅された造血細胞 (HPS) 細胞は、2週間で採取され、分析された。横軸は、抗体 5E1 の濃度を示す。A にコントロールストローマ細胞および B に *Ihh* ストローマ細胞と共培養した際の CFU-C (Colony-Forming Units in Culture) および CFU-mix の細胞数を示す。CD34+細胞数は、フローサイトメトリ分析で計測された CD34+細胞の割合から算出された。図中の\*は、初代ストローマ細胞に対する student's t test で  $p < 0.05$  である。

図5は、*ihh*-ストローマ細胞との共培養での 5E1 抗体による *ihh* の阻害実験を

示す。増幅された造血細胞（HPCs）は2週間で採取され、分析された。X軸は、細胞増殖期間を示す。なお、+は5E1添加群、-は5E1非添加群を表す。Y軸は細胞数を示す。（A）細胞総数。（B）CD34+細胞数。なお、CD34+細胞数は、フローサイトメトリー分析から得られるCD34+細胞の割合から算出された。（C）コロニー形成細胞数（CFU-C）。（D）HPP-CFC数スチューデントのテストで初代ストローマ細胞に対し $*P < 0.05$

図6は、ヒトゲノムとNOD/SCIDマウス中の%hCD45の分析（A）ヒトALU配列のPCR増幅をしてヒトゲノム中に見出される配列が確認された。レーン1, 2, 3: アクセサレリー細胞が移植されたマウス（3匹）。レーン4, 5, 6, 7, : 前共培養CD34+細胞が移植されたマウス（5匹）%hCD45は移植されたマウスのBM（骨髄）中でのヒトCD45陽性細胞（HPCs）の割合と示す。

（B）抗ヒトCD45抗体を用いた、移植8週間後のNOD/SCIDマウスのBM（骨髄）MNC（単核球細胞）のフローサイトメトリー分析の代表的なデータ NOD/SCIDマウスは、共培養されていないCD34+細胞（左上）、ストローマ細胞なしで増幅されたHPCs細胞（左下）、コントロールのストローマ細胞（右上）、ihhストローマ細胞（右下）が移植された。培養は2週間行われた。（C）移植13週間後のNOD/SCIDマウスのBM（骨髄）MNC（単核球細胞）のフローサイトメトリー分析の代表的なデータコントロールのストローマ細胞（上）又はihhストローマ細胞（下）で2週間増幅されたヒトCD45+細胞の生着率（%）Y軸は、PI（ヨウ化プロピジウム）での染色を示す。

図7Aは、HPCsのマルチリネージ染色を示す。骨髄に生着した細胞のHPCs多分化能が維持されているか否かのフローサイトメトリーでの確認。コントロール・ストローマ細胞との共培養系からのHPCsのマルチリネージ染色。

図7Bは、HPCsのマルチリネージ染色を示す。骨髄に生着した細胞のHPCs多分化能が維持されているか否かのフローサイトメトリーでの確認。ihhストローマ細胞との共培養系からのHPCsのマルチリネージ染色。

発明を実施するための最良の形態

本件発明は、（1）ヘッジホッグ遺伝子、好適には、インディアン ヘッジホッ

グ遺伝子を用いた造血系細胞の増殖方法。(2) ヘッジホッグ、好適には、インディアン・ヘッジホッグからなる造血系細胞増殖因子を有効成分とする造血系細胞増殖剤。(3) ストローマ細胞にヘッジホッグ遺伝子を導入することで、ヘッジホッグを過剰発現させたストローマ細胞及びその調製方法、好適には、既に hTERT 導入された骨髓ストローマ細胞にインディアン ヘッジホッグ遺伝子を導入することで、インディアン ヘッジホッグを過剰発現させた骨髓ストローマ細胞及びその調製方法、並びに(4) 該ストローマ細胞をヒト CD34 陽性細胞等の造血系細胞と共培養することによるヒトストローマ細胞の造血支持能の増強方法を提供する。

インディアン ヘッジホッグは液性因子としてのみならず、N 末および C 末の脂質修飾を介し膜結合性因子としても作用することから、ストローマに接着して増殖する造血幹細胞分化の支持能を増強すると考えられる。

インディアン ヘッジホッグ (以下 ihh と略することがある。) は、全長 411 アミノ酸からなるポリペプチドとして合成されるが、1~27 アミノ酸は、蛋白分泌のための signal peptide で、203~411 アミノ酸は細胞外に分泌されるまでに切断される。したがって体内で機能している ihh は、28~202 アミノ酸からなっている。

本発明で使用する ihh としては、例えば (a) 配列番号 1 で表されるインディアンヘッジホッグを用いることができる。更に、(b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28~202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド、(c) 配列番号 1 で表される配列において、1~数個のアミノ酸の欠失、置換、及び/又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド、及び (d) 配列番号 1 で表される配列中 28~202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて、1~数個のアミノ酸の欠失、置換、及び/又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

インディアン ヘッジホッグ遺伝子 (以下 ihh と略することがある。) としては、例えば、以下の (a) ~ (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がある。

(a) 配列番号 1 で表されるインディアン ヘッジホッグ、(b) 配列番号 1 で表され

る配列において少なくとも28～202のアミノ酸残基を含むポリペプチド、(c) 配列番号1で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド、及び(d) 配列番号1で表される配列中28～202のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド。

更に、具体的には、以下のDNAからなるインディアン ヘッジホッグ遺伝子には、以下を包含する。

(a) 配列番号2で表されるDNA

(b) 配列番号2で表されるDNA配列において81～606番目の塩基を少なくとも含むDNA

(c) 上記(a)又は(b)のDNAと緊縮条件下で、ハイブリダイズし、かつインディアンホッグ活性を有するタンパク質をコードするDNA

なお、緊縮条件下とは、例えばナトリウム濃度が、20～100mMであり、42℃～55℃での条件をいう[Molecular Cloning (Sambrookら編集(1989) Cold Spring Harbor Lab. Press, New York)]。

なおインディアン ヘッジホッグの造血系細胞増殖活性は、例えば、下記する本発明の実施例5におけるように、ihhを導入したストローマ細胞が造血細胞(HPC)を増幅するか増幅率で計測できる。

ストローマ細胞内でインディアン ヘッジホッグ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることができる。また、インディアン ヘッジホッグを、適切な緩衝液に溶解して用いて、直接造血系細胞とストローマ細胞の共培養物に添加することもできる。

ストローマ細胞の由来としては、哺乳動物のストローマ細胞、特にヒト由来のストローマ細胞が好適である。ストローマ細胞には、骨髓由来の初代ストローマ細胞、経代されたストローマ細胞及び遺伝子改変されたストローマ細胞が包含されるが、好適には、WO 03/038076号公報に記載のhTERT遺伝子が導入されたヒト骨髓ストローマ細胞（以下hTERTストローマ細胞という）を用いることができる。なお、hTERTの配列は、例えば、Science 277, p. 955-959に記

載されている。

hTERT ストローマ細胞は、例えば、次のようにして調製できる。

pCI-Neo-hTERT-HA より PCR にて得た hTERT EcoRV-SalI fragment を pBABE-hygro に cloning し pBABE-hygro-hTERT を調製する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol95, p14723-14728)。次に、BOSC23 パッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8392-8396, 1993) を用いて、 $\Psi$ CRIP パッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543, 1993) を作成する。上記のベクターを、レトロウイルス産生細胞 ( $\psi$ CRIP/P131) で増殖させる。

そして、感染を行う前日に、ストローマ細胞を播きなおし、レトロウイルスを産生する  $\psi$ CRIP/P131 の培地を代えて培養する。次に上清に産生された組み換えレトロウイルスベクターをストローマ細胞 (stromal cell) に感染させた。4 時間後培養上清を新しい培地に換えてさらに 2 日間培養した。その後、pBABE-hygro-hTERT はハイグロマイシン  $100 \mu\text{g/ml}$  で 5 日間、薬剤選択を行って hTERT ストローマ細胞を調製することができる。

ストローマ細胞に導入するインディアン ヘッジホッグ遺伝子は、好適には、ヒトのインディアン ヘッジホッグ遺伝子である。具体的には、配列番号 2 の遺伝子を用いることができる。

インディアン ヘッジホッグ遺伝子をストローマ細胞に導入するための方法としては、種々の遺伝子導入方法を用いることができるが、リポフェクション法は不適切で、好適には種々のベクターを用いることができ、好適には、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、特に好適にはレトロウイルスベクターを用いることができる。好適には、pRx-IRES-neo (Hum Gene Ther. 1998;9:1983-1993) を用いることができる。

hTERT 導入した骨髓ストローマ細胞にインディアン ヘッジホッグ遺伝子を導入した骨髓ストローマ細胞 (ihh ストローマ細胞と略すことがある。) を更に、造血系細胞と共培養して、造血系細胞を増幅することができる。

造血系細胞としては、臍帯血由来の CD 3 4 陽性細胞 (CB CD 3 4 + と略すこともある。)、造血細胞 (例えば、CB CD 3 4 + 細胞とストローマ細胞とを共培養することにより分離できる、HPCs : Hematopoietic cells)、造血幹細胞



HSC (Hematopoietic stem cell, ヒト造血幹細胞)、造血前駆細胞、Tリンパ球、及びBリンパ球を包含する。

造血系細胞と本願発明のストローマ細胞との共培養には、サイトカイン類を共存させることができ、例えば、共存させるサイトカインとしては、可溶性のSCF (k i t リガンド)、f l t 3 リガンド、トロンボポエチン (TPO) 等を挙げることができる。具体的には、TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml) 及び SCF (10ng/ml) を共存させることができる。共培養は、例えば、2 - 4 週間行うことができる。

[参考例 1]

初代ストローマ細胞、間葉系幹細胞におけるヘッジホッグ関連遺伝子の発現およびサイトカイン遺伝子の発現

インディアン ヘッジホッグ (ihh) は、胎生期のヨーク・サックの造血のみならず軟骨細胞からも分泌され骨端形成に重要な役割を果たすことが知られている。近年、軟骨細胞は骨髄間質幹細胞から分化してくることが示された。このことより、我々は ihh が骨髄間質細胞で発現している可能性を想定し、間葉系幹細胞、ストローマ細胞、造血細胞 (臍帯血) および HUVEC (血管内皮細胞) におけるヘッジホッグおよびそのレセプター分子の発現を、RT-PCR を用い、スクリーニングした。

具体的には、Total RNA は QIAGEN RNeasy キット (Qiagen) で精製し、RT 反応はスーパースクリプト<sup>TM</sup>II 逆転写酵素を用いた (Invitrogen, Tokyo, Japan)。得られた PCR 反応は AccuTaq LA ポリメラーゼミックス (シグマ) を用いて行った。94℃ (denaturation) 3 分、94℃ (denaturation) 30 秒、56℃ (annealing) 30 秒、72℃ (extention) 60 秒で 35 サイクル増幅した。表 1 に用いた primer を示した。PCR 産物は 2% のアガロース・ゲルで電気泳動分離し、エチジウム・ブロマイドで染色し可視化した。

表 1

表 1 使用されたプライマー

	センス	アンチセンス
lhh-C	5'-CTTCCGGGCCACATTTGCCAGCCA-3'	5'-GAGACGCCCCCAGCGGTAGAGCA-3'
lhh-N	5'-TGCGGGCCGGGTCGGGTGGTG-3'	5'-GCCGCCCGTCTTGGCTGC-3'
Shh-1	5'-TACAACCCCGACATCATATTTAAGG-3'	5'-CGTCTCGATCACGTAAGACCTTC-3'
Shh-2	5'-CACCTGGAGCGGTTAGGGCTACTCT-3'	5'-GCCCAGGGCACCATTCTCATCAAC-3'
Ptc1	5'-CTGTTGGCATAGGAGTGGAGTTCACC-3'	5'-CTGCTGGGCTCGTAGTGCCGAAGC-3'
Smo	5'-CAGAACATCAAGTTCAACAGTTCAGGC-3'	5'-ATAGGTGAGGACCACAAACCAACACACC-3'
Ang1	5'-GGTCACACTGGGACAGCA-3'	5'-CGTAAGGAGTAAGTGGGC-3'
BMP4	5'-GCCAAGCGTAGCCCTAAGCATCACTCA-3'	5'-CAATGGCATGGTTGGTTGAGTTGAGGT-3'
$\beta$ -actin	5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'	5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'

## (結果)

その結果、ihh は骨髄間葉系幹細胞およびストローマ細胞のいずれでも mRNA の発現を検出し得た。興味深いことに、血球細胞である臍帯血で ihh が高度に発現していた。さらに、間葉系幹細胞およびストローマ細胞のいずれでも ihh のレセプター分子である Patched (PTC) およびシグナル伝達分子である smoothened (SMO) の発現を認め (図 1 A)、このことは Bhardwaj らの報告と一致していた (Nat Immunol. 2001;2:172-180)。

また、造血幹細胞を増幅させることが報告されているソニック・ヘッジホッグ (SHH) の発現を検討してみたが、HUVEC (血管内皮細胞) および胸腺組織 (陽性コントロール) では mRNA の発現が検出されるものの、骨髄間質細胞における発現は検出感度以下であった (図 1 B)。

以上のことより、我々は ihh が骨髄微細環境で何らかの役割を演じている可能性を推定した。さらに、CD34 陽性細胞における ihh のレセプター分子の mRNA の発現を検討してみたところ、未分化造血細胞である CD34 陽性分画 (純度 95%) では、ihh のシグナル伝達分子である SMO の発現を認めたことから (図 1 C)、ihh は未分化な造血細胞に対して、働く可能性が示唆された。

## [参考例 2]

## 抗ヘッジホッグ中和抗体 5E1 の調整

Hybridoma 5E1 は IOWA Developmental studies ハイブリドーマ・バンクから購入した。ハイブリドーマは 10%FBS 含 IMDM、2 mM glutamin、1%P/S (50 U/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin) で培養した。ハイブリドーマ接種の 1 週前に Balb C マウスの腹腔内に 1 ml の pristane を投与した。対数増殖期にあるハイブリドーマ細胞はオートクレイブ滅菌した PBS で 2 回洗浄した後、 $2.5 \times 10^6$  細胞/ml に調整した。22G 針を使って、 $5 \times 10^6$  個細胞を腹腔内に投与した。その後、腹水が形成されるまで 10 日間マウスを放置した。腹水からのモノクローナル・抗体 5E1 (IgG1) の精製はプロテイン G カラム (ImmunoPure (R) PIERCE) を用いて行った。pH5.0 のバッファ (ImmunoPure (R) PIERCE) で洗浄した後、pH2.8 のバッファ (ImmunoPure (R) PIERCE) でエリ्यूションした直後に、1M リン酸塩バッファ pH7.5 で中和した。IgG の量 (mg/ml) は、A280/14x10 で算出した。

〔実施例 1〕 インディアン ヘッジホッグ遺伝子導入 hTERT ストローマ細胞 (以下 ihh-ストローマ細胞という) の調製

### 1. ヒト骨髓ストローマ細胞の培養

ヒトの骨髓細胞はインフォームド・コンセントの後に健康成人ボランティアの後腸骨稜から穿刺して得た。骨髓単核細胞 (MNCs) を  $150\text{-cm}^2$  プラスチック・ディッシュにいれ、一昼夜培養した。非付着細胞を洗浄除去した後に、付着細胞を骨髓初代ストローマ細胞として用いた。hTERT ストローマ細胞は、上に摘示した WO 03/038076 号公報に記載の方法で調整した。hTERT-ストローマ細胞を用いることで遺伝子導入ストローマ細胞株を樹立した。これらのヒト・ストローマ細胞は Minimal essential medium- $\alpha$  に、12.5% の馬血清 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA)、12.5% の胎児牛血清 (Gibco BRL)、 $1 \times 10^{-6}$  M hydrocortisone (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA) および  $1 \times 10^{-4}$   $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma Chemical Corp) を添加した (LTC) 培地で 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。間葉系幹細胞の培養は、上記のプラスチック・ディッシュに付着した細胞を、非動化した胎児牛血清 (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) を添加した Dulbecco modified essential medium (DMEM) で培養した。

### 2. Retroviral vector と遺伝子導入

バイシストロニックなレトロウイルス・ベクター pRx-IRES-hrGFP を作成するために、pRx-IRES-neo の neomycin resistant gene を、phrGFP-C plasmid (Stratagene, La Jolla, CA) 由来の hrGFP (humanized Renillareniformis green fluorescent protein) ( $\sim 717$  bp) に置き換えた。DH5  $\alpha$  コンピテント細胞 (Life Technologies, Grand Island, NY) に形質転換後、pRx-ires-hrGFP を含んでいるコロニーは mini-preparation (Bio Rad, Hercules, CA) した後に制限酵素消化によって確認することで得た。

Indian Hedgehog (ihh) の N 末が、その全活性の発揮し、C 末は活性を持たないことが報告されている。ihh の N 末 (ihh-N、1-202) cDNA の合成は、帯血由来の RNA を鋳型として逆転写反応を oligo-dT をプライマーとして施行した。Polymerase chain reaction (PCR) は以下のプライマーを用いて行った。

5' -AGGATCCACCATGTCTCCCGCCCGGCTCCGGCCCCGACTGCACTTC- 3' および 5'

-GAGCGGCCGCTTAGCCGCCCGTCTTGGCTGCGGCCGAGTG-3'.

センス・プライマーには BamHI をアンチセンス・プライマーには NotI サイト挿入した。アガロースゲル電気泳動後に PCR 産物を精製し、クローニングベクターである pGEM-T easy にライゲーションした (Life Technologies, Grand Island, NY)。DH5  $\alpha$  を形質転換した後、ihhcDNA を含んでいるコロニーは制限酵素消化によって同定した。DNA のシーケンス決定し、得られた ihh-N に問題が無いことを確認した。

pRx-ihh-IRES-hrGFP レトロウイルスベクターを作成するために、pGEM-T easy から ihh-N 末の cDNA を制限酵素 BamHI と NotI (New England Biolabs, Beverly, MA) の二重消化で切り出し精製した。これを pRx-IRES-hrGFP の BamHI と NotI にライゲーションした。DH5  $\alpha$  を転換した後に、pRx-ihh-IRES-hrGFP を含んでいるコロニーを制限酵素 (endonuclease) 消化によって同定した (図 2 (A))。

### 3. 組み換えレトロウイルスベクター産生細胞の作製

(1) Phoenix-AMPHO 細胞を 10cm dish にトランスフェクションの 18~24 時間前に  $5.5 \times 10^6$  個播いた。

(2) 15  $\mu$ g の上記の 2 種のレトロウイルス・ベクター pRx-IRES-hrGFP あるいは pRx-ihh-IRES-hrGFP に、OPTI-MEM (Gibco/BRL) を 800  $\mu$ l 静かに加え、攪拌し A 液を調製した。

(3) 滅菌されたチューブに OPTI-MEM を 750  $\mu$ l 採り、LIPOFECTAMINE (2 mg/ml Gibco/BRL) を 50  $\mu$ l 加えてゆっくり混ぜ B 液を調製した。

(4) A 液を静かに B 液に混ぜ C 液を調製し、室温で 30~45 分放置した。

(5) Phoenix-AMPHO 細胞を抗生剤, FBS を除いた 37℃ の培地で 1 度洗った。

(6) C 液 (1.6 ml) を静かに Phoenix-AMPHO 細胞に加えた。

(7) 更に、2.4 ml の OPTI-MEM を加えた。

(8) 5 時間, 5%CO<sub>2</sub> 下でインキュベートした。

(9) 4 ml の 20%胎児ウシ血清を含む DMEM を加え、1 晩インキュベートした。

(10) 24 時間後、Phoenix-AMPHO 細胞の培地を 0.45  $\mu$ m のシリンジフィルターで濾過し、Phoenix-AMPHO の培地を 5 ml の濾過した培地に交換した。同時にポリブレン (Hexadimethrine Bromide, SIGMA H-9268) を 8  $\mu$ g/ml になるように加え-80℃

に凍結保存した。

#### 4. 骨髄ストローマ細胞へのトランスフェクション

次に、上記の2種のレトロウイルス・ベクターを骨髄ストローマ細胞にトランスフェクション (transfection) した (pRx-ihh-IRES-hrGFP を導入した hTERT ストローマ細胞は、実施例1で調製した ihh-ストローマ細胞と呼ぶ。)

まず、トランスフェクションを行う前日に、hTERT ストローマ細胞を  $5 \times 10^4$  cell/10 cm dish となるように播きなおし、当日に、凍結保存した上清を 37℃ の恒温槽で溶解させ、組み換えレトロウイルスベクターを骨髄ストローマ細胞 (stromal cell) に感染させた。4 時間後培養上清を新しい培地に換えてさらに 2 日間培養した (図 2 (B))。

GFP 陽性ストローマ細胞を FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いることで、5 万個の細胞をソーティングした。ソーティング後の GFP 陽性細胞の純度はコントロール・ストローマ細胞 (pRx-IRES-hrGFP を導入した hTERT-ストローマ細胞を以下の実施例中でもコントロール・ストローマ細胞と呼ぶ。) 及び ihh-ストローマ細胞で、それぞれ 96.7% および 93.3% であった。

#### [実施例 2]

ihh 遺伝子導入ストローマ細胞の表面抗原および遺伝子発現の確認

(1) 実施例1で得られた ihh 発現細胞において、ストローマ抗原の発現が維持されているか否か (ref)、SH2 (CD105, endoglin) および SH3 (CD73) の発現、および GFP 陽性率を検討した。

ストローマ細胞の表面抗原をフローサイトメトリーを用い解析した。細胞を 0.1 % 牛血清アルブミン (BSA) 含 PBS で、2 回洗浄した後、 $5 \times 10^5$  細胞を抗 CD73 (SH3) (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) あるいは抗 CD105 (SH2) (Immunotech, Marseille, France) 抗体で 30 分の間、4 ° C でラベルした。二次抗体として R-phycoerythrin (PRE) F(ab')<sub>2</sub> を用いた。細胞は EPICS XL flowcytometer を用い解析した。死細胞は前方散乱および側方散乱でゲートを掛け除外した。

GFP の発現率はコントロールおよび ihh-ストローマ共に 90% 以上の純度であり、また GFP 陽性細胞では SH2 および SH3 などのストローマの抗原の発現が保たれて

いた (図 2 (C))。

### [実施例 3]

#### ihh 遺伝子導入ストローマ細胞の遺伝子発現の確認

(1) hTERT ストローマ細胞におけるヘッジホッグ遺伝子の発現は RT-PCR を用い解析した。Total RNA は QIAGEN RNeasy キット (Qiagen) で精製し、RT 反応はスーパースクリプト<sup>TM</sup> II 逆転写酵素を用いて行った (Invitrogen, Tokyo, Japan)。得られた PCR 反応は AccuTaq LA ポリメラーゼミックス (シグマ) を用いて行った。94℃ (denaturation) 3 分、94℃ (denaturation) 30 秒、56℃ (annealing) 30 秒、72℃ (extention) 60 秒で 35 サイクル増幅した。表 1 に用いた primer を示した。PCR 産物は 2% のアガロース・ゲルで電気泳動分離し、エチジウム・ブロマイドで染色し可視化した。

(2) 実施例 1 で調製した ihh-ストローマ細胞における ihh-N の蛋白発現は immunoblot で解析した。ihh-ストローマ細胞の培養上清 20  $\mu$ l を 4/25% の SDS-polyacrylamide 濃度勾配ゲルで分離し、そしてセミドライ・トランス・ブロット (Bio-Rad) で PVDF メンブレンに転写した。抗 ihh 抗体 (5E1; IOWA hybridoma bank) でヘッジホッグ・タンパクをラベルした。ラベルされた蛋白は ECL (Amersham Pharmacia) で検出した。

#### (結果)

RT-PCR は、ihh の N 末側を検出する primer を用いて行った。コントロールのストローマでは ihh-N は検出感度以下であったが (C 末は検出可能)、ihh-ストローマ細胞では ihh-N が容易に検出できた (図 2、(D))。

次に、ストローマの培養上清への ihh-N の分泌を、western blot 法で検討した。ストローマの上清は、PBS で 3 回洗浄した後、無血清培地 X-VIVO10 に置き換え、72 時間培養後に得た。抗体はヘッジホッグ・モノクローナル抗体 5E1 を用いた。コントロール・ストローマの上清では ihh-N は検出感度以下であったが、ihh-ストローマ細胞の上清では ihh が検出できた (図 2 (E))。

### [実施例 4]

#### 臍帯血 CD34 陽性細胞とストローマ細胞の共培養

4 万個のコントロールおよび実施例 1 で調製した ihh-ストローマ細胞を 25 cm<sup>2</sup>

flask に播いた。サブコンフルエントになった時点で、PBS で 3 回洗浄を繰り返すことにより、ストローマ培地に含まれていた血清を取り除いた。そして、X-VIVO10 with TP0 (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) を添加し、あらかじめ X-VIVO10 (TP0 (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) 含有) にいれてある  $5 \times 10^3$  CD34+ 臍帯血細胞を加えた。こうして、CD34+ 臍帯血の存在下ベクターにより遺伝子導入したストローマ細胞と 2 週間共培養した。培養上清を回収し、 $2 \times 10^3$  細胞をコロニーアッセイに用いた。2 週間後にコロニーをカウントした。また、共培養時にヘッジホッグを中和する目的で 500 の  $\mu$ g の 5E1 を 3 日ごとに共培養システムの中に添加した。ストローマ細胞の上に増幅された造血細胞を回収し、フローサイトメトリーおよびコロニーアッセイで解析した。コロニーアッセイは MethoCult GF H4434V (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) を用いて行ない、14 日間培養後コロニー数を顕微鏡下でカウントした。

#### (結果)

ストローマ細胞と共培養して得られた細胞を、フローサイトメトリーで解析した。コントロールのストローマで増幅した細胞の CD34 陽性率は 22% から 27% であったが、ihh を高発現させたストローマ細胞で増幅した CD34 陽性率は、31% から 35% と高度に保たれていた。増幅した造血細胞の分化抗原を検討したところ、CD3、CD19 などのリンパ球抗原、GPA および CD41 のような赤芽球および巨核球抗原の発現率に差を認めなかった。しかしながら、顆粒球系抗原である CD11b に関しては、コントロールのストローマで増幅した造血細胞の陽性率は 45% 前後と高率であったが、ihh を高発現させたストローマ細胞で増幅した場合には、30% 以下に抑えられていた。このことより ihh ストローマでは、コントロール・ストローマに比較して、顆粒球系への分化が抑制され、未分化な CD34 陽性細胞分画が保たれる可能性が示唆された。(図 3)

次に、コロニーアッセイにより、未分化造血細胞が支持されているか否か検討した(表 2)。ihh ストローマで増幅させ得られた造血細胞の総細胞数、総 CD34、CFU-C (Colony Forming Unit in Culture、)、CFU-mix (Colony-Forming Units mixed cells、幼弱コロニー形成細胞) および HPP-CFC 数は、コントロール・ストローマで増幅したものよりも有意に高値を示していた。また、コントロールとの差を見



ると、CFU-mix および HPP-CFC などのより幼若なコロニー形成能のある造血前駆細胞でその差が顕著であった。

表 2

表2. 2週間の臍帯血CD34陽性細胞(CB CD34+) Ex vivo での増幅

	ストローマ細胞なし	コントロールストローマ細胞	lh $\alpha$ 導入ストローマ細胞
総細胞数	76 $\pm$ 36	490 $\pm$ 38	635 $\pm$ 30 **
CD34+細胞数	5 $\pm$ 2	26 $\pm$ 2	95 $\pm$ 6 **
CFC	2 $\pm$ 1	26 $\pm$ 2	59 $\pm$ 3 **
CFU-Mix	8 $\pm$ 7	63 $\pm$ 37	349 $\pm$ 116 *
HPP-CFC	12 $\pm$ 11	200 $\pm$ 175	1784 $\pm$ 1555 *

数値は、当初の細胞数に対する増加倍数を示す。for lh $\alpha$ -stroma vs. control stroma. \*P<0.05; \*\* P<0.01. 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表されている。(n=8)

CFC-コロニー形成細胞

CFU-mix-幼弱コロニー形成細胞

HPP-CFC-高増殖能維持コロニー形成細胞

## [実施例5] 抗 ihh 抗体による ihh の阻害

(1) 実施例4で見られた ihh ストローマによる造血細胞の増幅が、ihh による直接作用なのか、ストローマ細胞上に発現するヘッジホッグ・レセプターを介した間接作用なのか検討する目的で、抗体を用いた中和実験を行った。

C B (臍帯血) C D 3 4 + 細胞は、サイトカイン類(TP0 (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml) 以下サイトカイン類は同じ濃度を用いた)の存在下で、3日ごとに100  $\mu$ g/mlの5E1抗体を添加して、又は添加せずに、ihh ストローマ細胞と共に又はストローマ細胞なし(コントロール)で培養された。1 x PBS がコントロールの培養皿には添加された。

## (結果)

図4に結果を示す。増幅された造血細胞(HPS)細胞は、2週間で採取され、分析された。横軸は、抗体5E1の濃度を示す。Aにコントロールストローマ細胞およびBにIhhストローマ細胞と共培養した際のCFU-C (Colony-Forming Units in Culture) およびCFU-mixの細胞数を示す。なお、CD34+細胞数は、フローサイトメトリー分析で計測されたCD34+細胞の割合から算出された。なお、図中の\*は、初代ストローマ細胞に対するstudent's t testで $p < 0.05$ である。

コントロール・ストローマおよびihh-ストローマによる造血細胞の増幅は、中和抗体で優位に抑制された。このことより、ihhはストローマによる造血細胞増幅に重要な役割を果たすと共に、ihhストローマの造血支持能の増強には、ihhの直接的効果が関与している可能性が示された(図4)。

## [実施例6]

## (1) NOD/SCID マウスへの移植

移植対象として、L Shultz (Jackson Laboratory, bay Harbor, ME, USA) から得られた親マウスから得られた6-10週齢のNOD/SCID-s2m-/-マウスが用いられた。TP0、SCF、FLの存在下で、コントロール・ストローマ細胞又はihh-ストローマ細胞の層とCB CD34+細胞を2週間共培養させた。その後、当該ストローマ細胞層の上方で増殖した造血細胞(HPCs Hematopoietic cells)を回収した。造血細胞

中のストローマ細胞の混入率は、顕微鏡下で 0.01% 以下であった。ストローマ細胞は、顕微鏡下で、細胞の大きさ及び形態的特徴に基づいて造血細胞から簡単に見分けることができる。

(i) CB<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (コントロール・ストローマ細胞又は Ihh-ストローマ細胞との共培養する前の細胞)、CB<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を単独で 2 週間培養 (ストローマなし、サイトカイン類 (TPO (50ng/ml)、FL (50ng/ml)、SCF (10ng/ml)) 添加で培養し得られた細胞数のこと)、又は CB<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞とコントロール・ストローマ細胞若しくは ihh-ストローマ細胞との共培養を 2 週間して増殖された幼弱造血細胞 (HPC: primitive hematopoietic progenitor cells) が、400 cGy で照射されたマウスに、外側尾静脈を通じて注射した。

正常なボランティアからの末梢血単核球細胞で 1,500 cGy で照射された  $5 \times 10^6$  細胞が、アクセサリー細胞として造血細胞と同時に又は単独で移植された。

次に増幅された造血細胞が、骨髓に生着し骨髓再建に寄与し得るか検討した。

#### (結果)

移植後のスキッドマウスにおけるヒト血球のキメリズムは、抗 CD45 抗体を用いたフローサイトメトリーで決定した。表 3 に示すごとく、ihh-ストローマ上で 2 週間増幅した造血細胞は、コントロールのストローマで増幅した場合に比較し、約 30 倍の生着率を認めた。これまで我々は、ストローマ細胞上のみならずストローマ細胞に潜りこんだ細胞の両者を同時に移植することで、ヒト・ストローマ細胞が造血再建能を維持した細胞 (SRC) を支持する可能性を報告してきた。しかしながら臨床応用を考えた場合には不死化ストローマは除くことが望ましく、プラスチック・ディッシュに付着させることで行ってきたが、その完全な除去は困難であった。本研究においては ihh ストローマ細胞上に増えた細胞で十分な造血再建が可能であったことから、ストローマ細胞と造血細胞の間にフィルターを入れるなどの操作で比較的容易に、ストローマ細胞の混入を防ぐことが可能であると考えられる。

表 3

表3. 移植後8週間での骨髓及び末梢血への hCD45+ cells の定着

	再構成された細胞を有するマウス数/移植を受けたマウス数	移植を受けたマウスの骨髓中の CD45+ 細胞、 %	移植を受けたマウスの末梢血中の D45+ 細胞、 %
アクセサリー細胞	0/4	ND	ND
非共培養	3/7	0.33±0.47	ND
ストローマ細胞なし	2/4	0.24±0.30	ND
コントロールストローマ細胞	7/7	0.74±0.53	0.13±0.05
lhh導入ストローマ細胞	7/7	10.6±8.20 *	0.60±0.27*

ND は %hCD45 値がカットオフレベルの 0.1%以下であることを示す。値は土標準偏差で示されている。\* $P<0.05$ , コントロールのストローマグループとの比較において (Mann-Whitney *U* test) .

## (2) 移植細胞の定着 (A)

マウスは、移植後8週間又は13週間後に、頸椎脱臼により、屠殺し、骨髄と末梢血単核球を回収した。ヒトの造血細胞の存在は、ALU 反復配列をPCRで検出すること、及び抗ヒトCD45特異的抗体を用いて、フローサイトメトリーにより行われた。

PCRは、具体的には、プライマー配列としては、5'-CACCTGTAATCCCAGCAGTTT-3' 及び 5'-CGCGATCTCGGCTCACTGCA-3' を用いて行われた。DNA 試料は94度で4分間変性し、94度で1分(変性)、55度で45秒(アニーリング)、更に72度で1分(伸長)からなるサイクルを35サイクルし増増幅した。増幅産物は、2.5%アガロースゲル電気泳動上でエチジウム ブロマイド染色で221bpのバンドとして可視化された。

### (結果)

結果は、図6に示す。

図6(A): アクセサリー細胞だけが移植されたマウスでは、(レーン1, 2, 3)では、反応は見られないが、前共培養されたCB CD 3 4+細胞が移植されたマウス(レーン4, 5, 6, 7,)では、ヒトのALUの存在が見られた。

なお、数字は、移植マウスの骨髄中でのヒトCD45陽性細胞の割合を示す。

図6(B): 抗ヒトCD45抗体を用いた移植後8週間後のマウスの骨髄単核細胞のフローサイトメトリー分析結果が示されている。ihh ストローマ細胞と共前培養されたCB CD 3 4+細胞を移植されたマウスからは、ヒトCD45+細胞が頻繁に見出されている。これは、コントロールのストローマ細胞に比較して、ihh ストローマ細胞は、CB CD 3 4+細胞中の、SRCをより顕著に増幅していることを示している。

図6(C): 抗ヒトCD45抗体を用いた移植後13週間後のマウスの骨髄単核細胞のフローサイトメトリー分析結果が示されている。移植期間を延長しても、ihh ストローマ細胞と共前培養されたCB CD 3 4+細胞を移植されたマウスからは、ヒトCD45+細胞を維持していることが分かる。

## (2) 移植細胞の生着の検討

マウスは、移植後6週間で頸椎脱臼により、屠殺し、骨髄と末梢血単核球を回

収した。ヒトの造血細胞の存在は、FITC-抗ヒト CD45 コンジュゲートにより染まる細胞を、フローサイトメトリーを用いて検出した。

次に、骨髓に生着した細胞が、多分化能を維持しているかフローサイトメトリーで検討した。

(結果)

結果を図 7 A、図 7 B に示す。

ihh で増幅させた造血細胞は、既報 ( Nat Med. 1996;2:1329-1337 ) のごとく CD11b、CD19、CD38 陽性細胞に分化可能であり、分化能はコントロール・ストローマで増幅した際と同様に維持されている可能性が示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

ihh 遺伝子をヒト骨髓ストローマ細胞に遺伝子導入することで、ihh を過剰発現させると、その直接作用および間接作用を介して、造血支持能を増強することができる。

さらに、本発明で得られた造血支持能が強力な ihh 発現自己ストローマ細胞を用いることで、自己造血幹細胞を増幅する新たな技術を開発できるものである。

## 請求の範囲

1. 次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を用いて該ポリペプチドを発現させることを含む造血系細胞増殖方法。

(a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド

(b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28 ～ 202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号 1 で表される配列において、1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号 1 で表される配列中 28 ～ 202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて 1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

2. 次の (a)、(b) 又は (c) の DNA からなる遺伝子を発現させることを含む造血系細胞増殖方法。

(a) 配列番号 2 で表される DNA

(b) 配列番号 2 で表される DNA 配列において 81 ～ 606 番目の塩基を少なくとも含む DNA

(c) 上記 (a) 又は (b) の DNA と緊縮条件下で、ハイブリダイズし、かつインディアンホッグ活性を有するタンパク質をコードする DNA

3. 次の (a)、(b)、(c) 又は (d) の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子が導入された骨髓ストローマ細胞。

(a) 配列番号 1 で表されるポリペプチド

(b) 配列番号 1 で表される配列において少なくとも 28 ～ 202 のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号 1 で表される配列において、1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換、付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号 1 で表される配列中 28 ～ 202 のアミノ酸で表されるポリペプチド



ドにおいて、1～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

4. 骨髓ストローマ細胞が、hTERT（ヒトテロメラーゼ触媒ドメイン）遺伝子が既に導入されたストローマ細胞である請求項3記載の骨髓ストローマ細胞。

5. 造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子がレトロウイルスベクターを用いて導入された請求項3又は4記載の骨髓ストローマ細胞。

6. 請求項3～5記載いずれか1項記載の骨髓ストローマ細胞を造血系細胞と共培養することを含む造血系細胞増殖方法。

7. 造血系細胞が、臍帯血由来のCD34陽性細胞である請求項6項記載の方法。

8. 共培養を、サイトカインの存在下で行う請求項6又は7記載の方法。

9. 共培養を2～4週間行う請求項6～8いずれか1項記載の方法。

10. 請求項3～5いずれか1項記載の骨髓ストローマ細胞と造血系細胞を含む人工骨髓。

11. 次の(a)、(b)、(c)又は(d)の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を含む造血作用増強用発現ベクター。

(a) 配列番号1で表されるポリペプチド

(b) 配列番号1で表される配列において少なくとも28～202のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号1で表される配列において、1～数個のアミノ酸の欠失、置換、付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号1で表される配列中28～202のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて1～数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

12. 次の(a)、(b)、(c)又は(d)の造血系細胞増殖活性を有するポリペプチドを有効成分として含む造血系細胞用増殖剤。

(a) 配列番号1で表されるポリペプチド

(b) 配列番号1で表される配列において少なくとも28～202のアミノ酸残基を含むポリペプチド

(c) 配列番号 1 で表される配列において、1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

(d) 配列番号 1 で表される配列中 28 ～ 202 のアミノ酸で表されるポリペプチドにおいて 1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するポリペプチドであって、造血系細胞増殖活性を有するポリペプチド

13. 造血系細胞がヒト造血細胞又はヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞である請求項 12 記載の増殖剤。

図 1

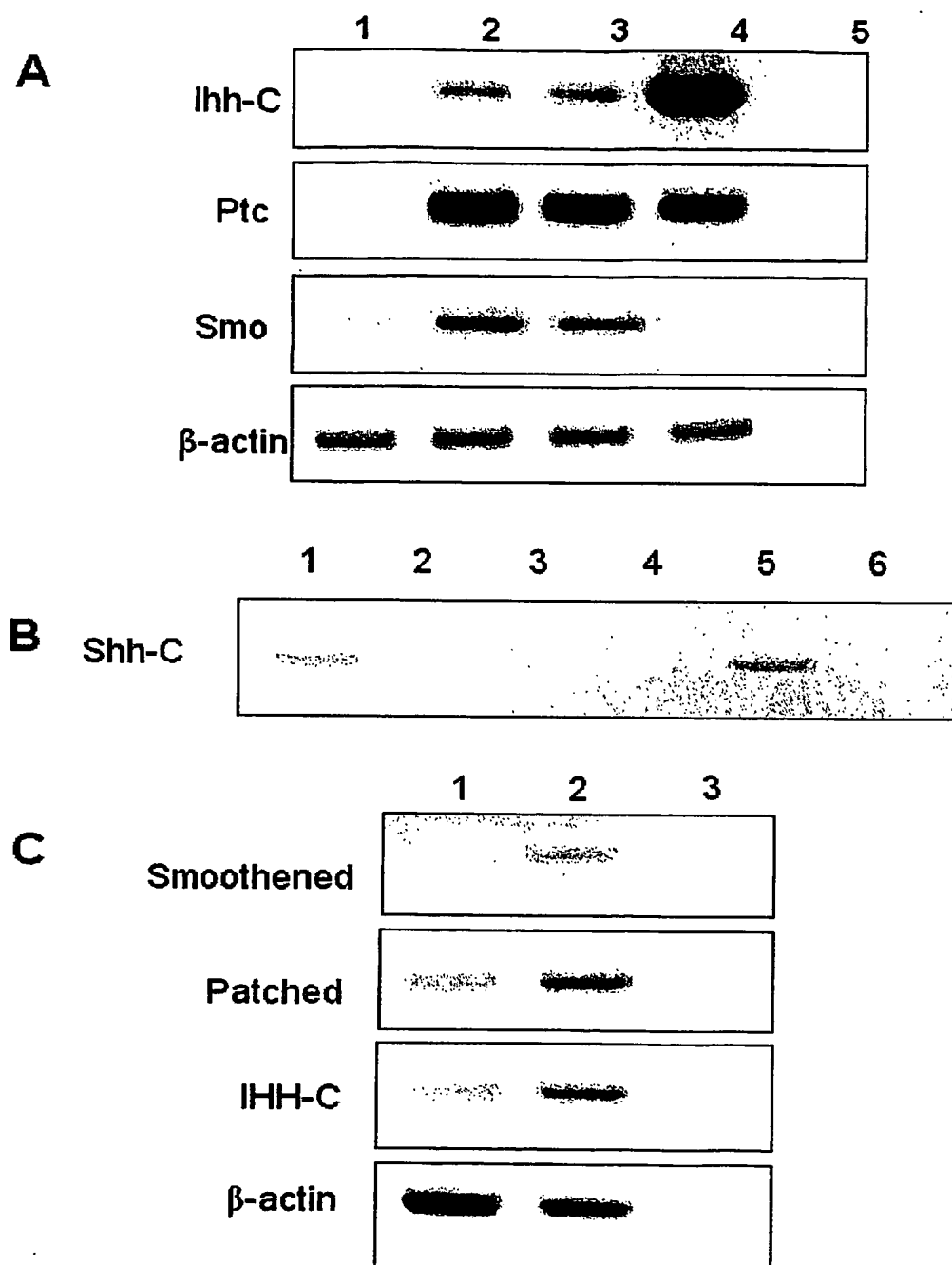
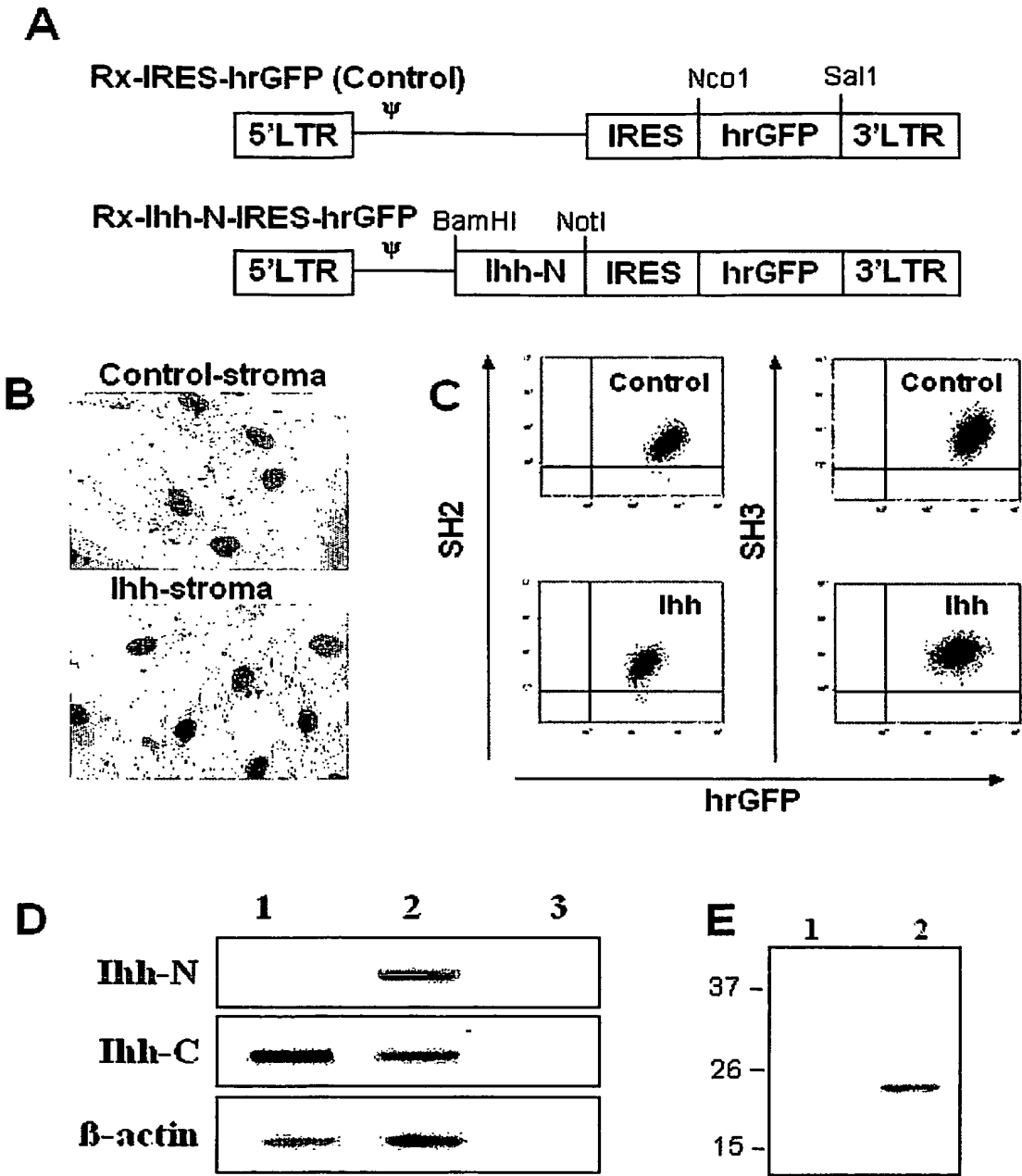
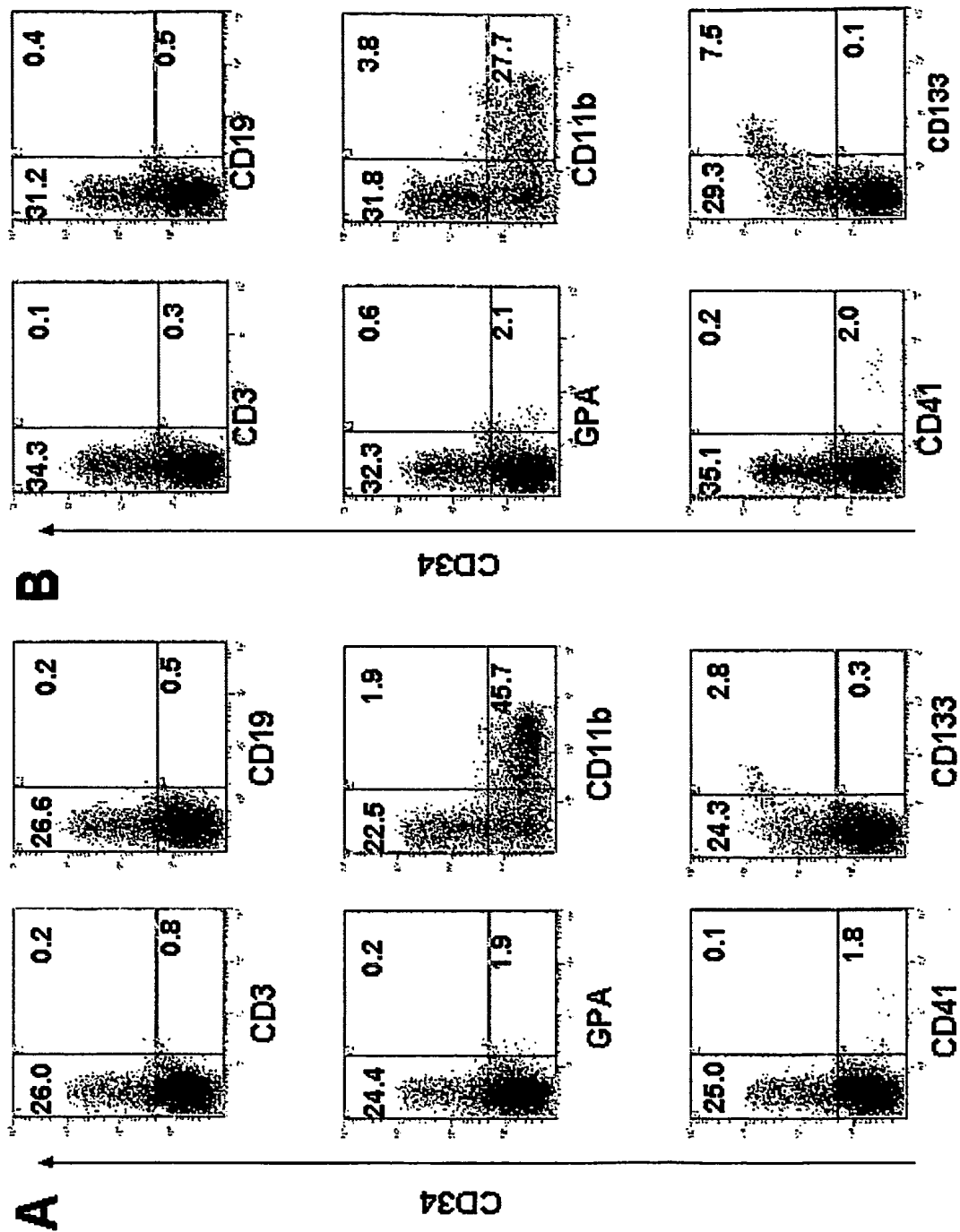


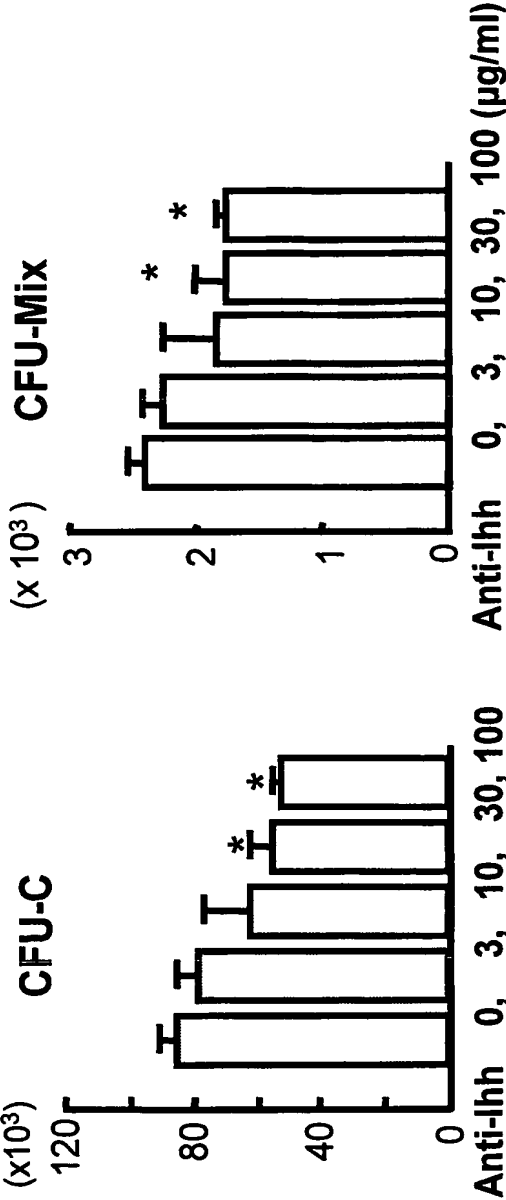
図 2



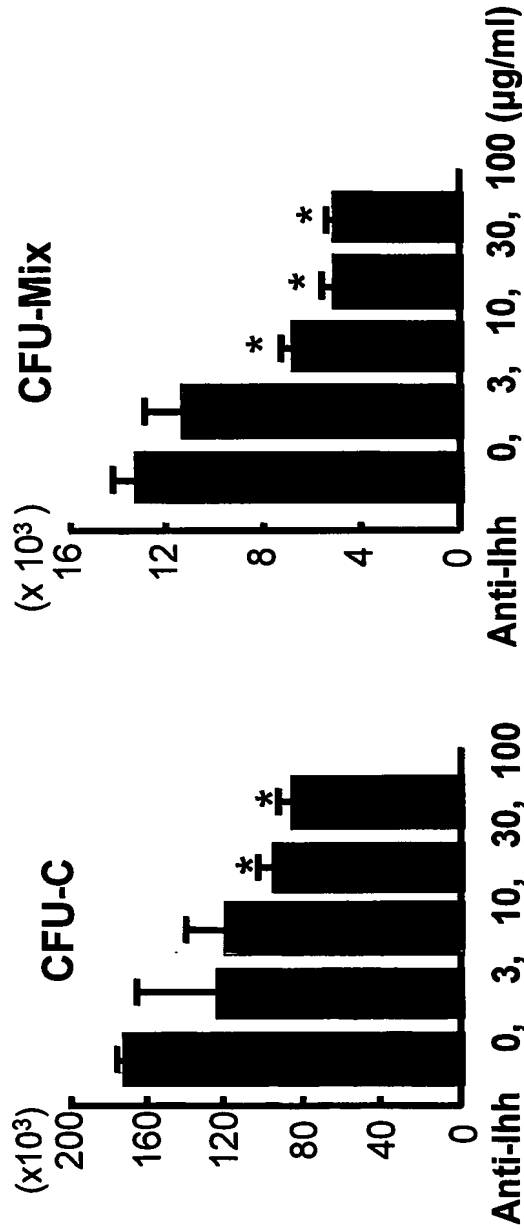


4

**A Control stroma**



**B Ihh-stroma**



5

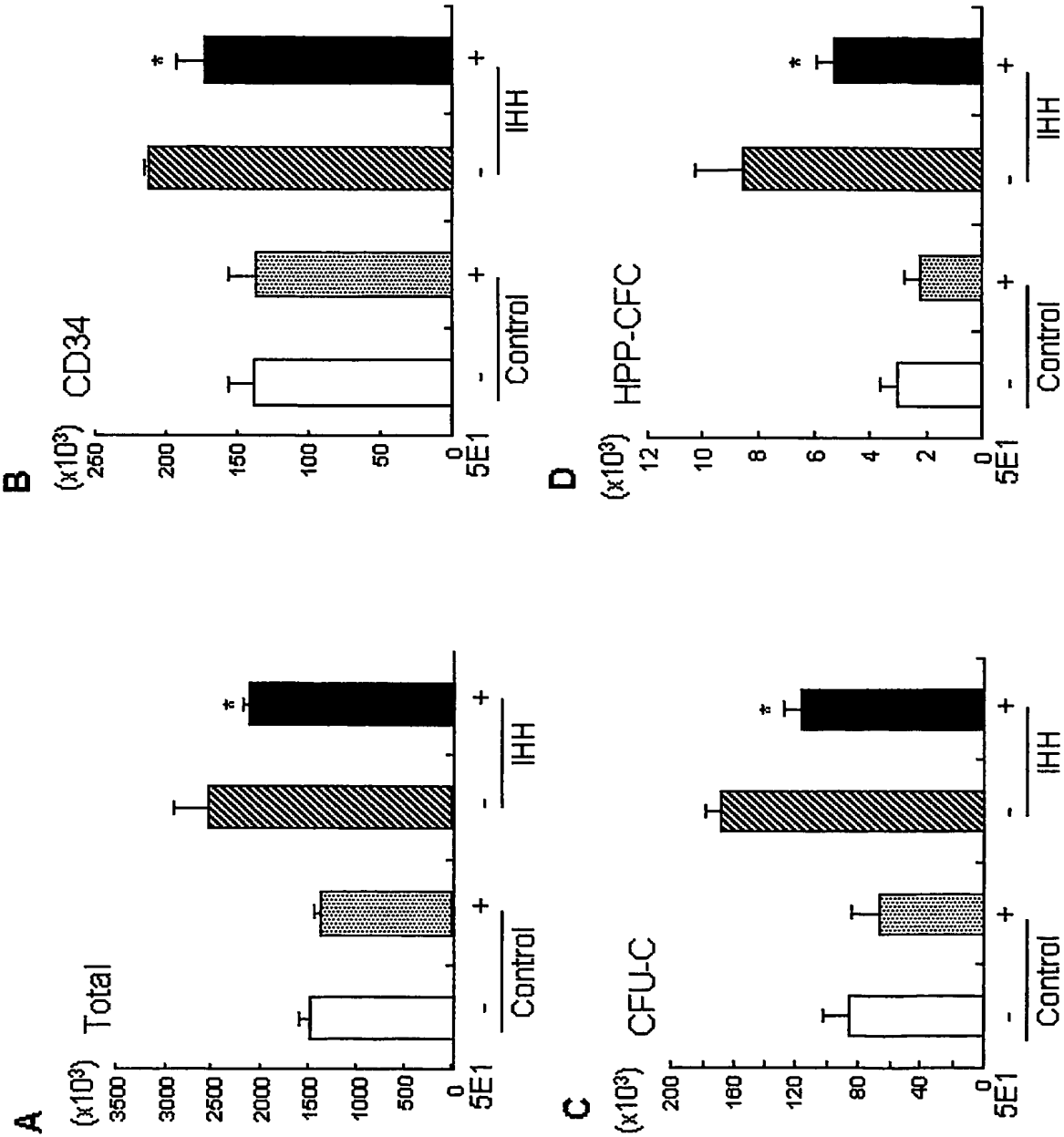
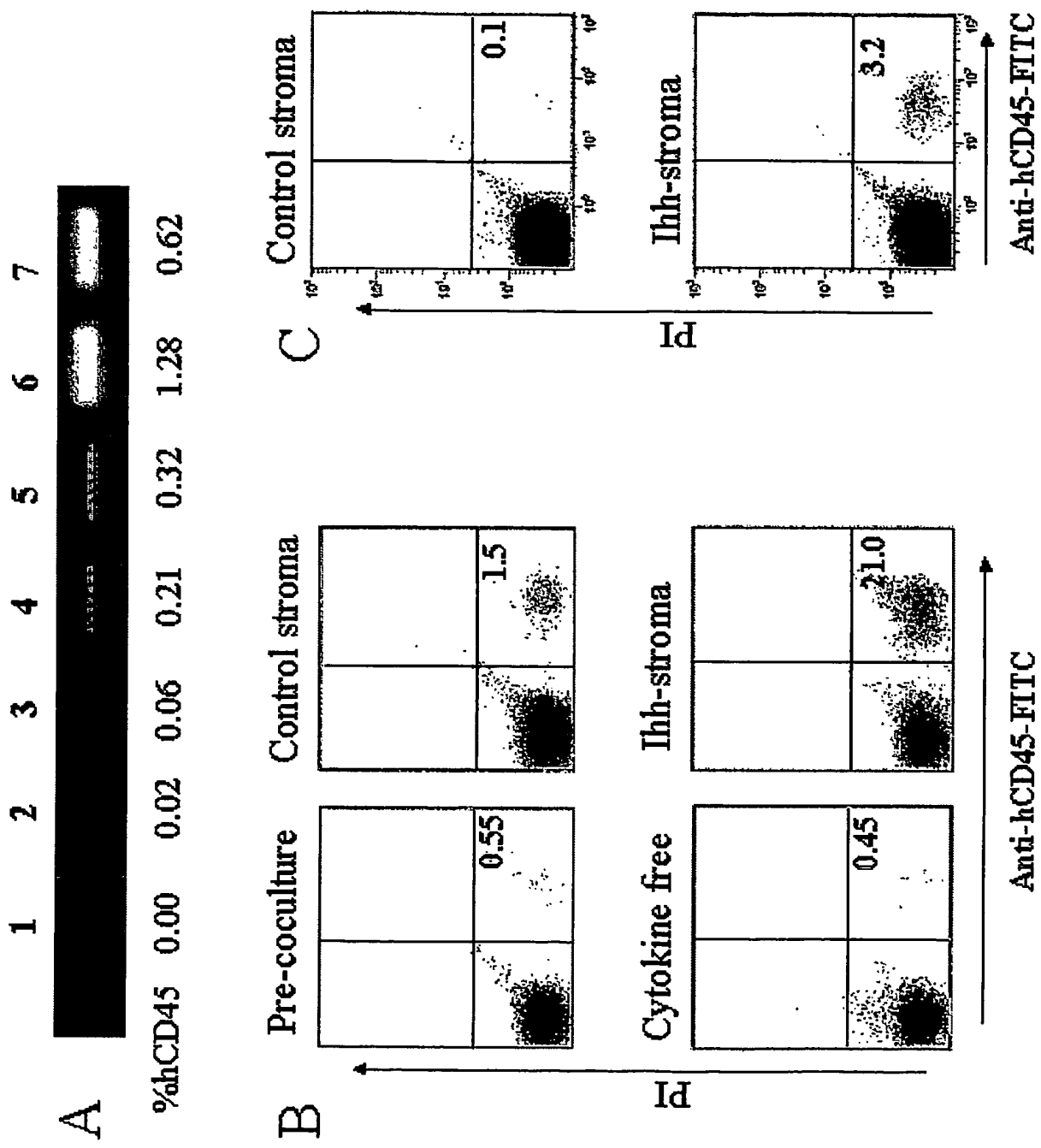


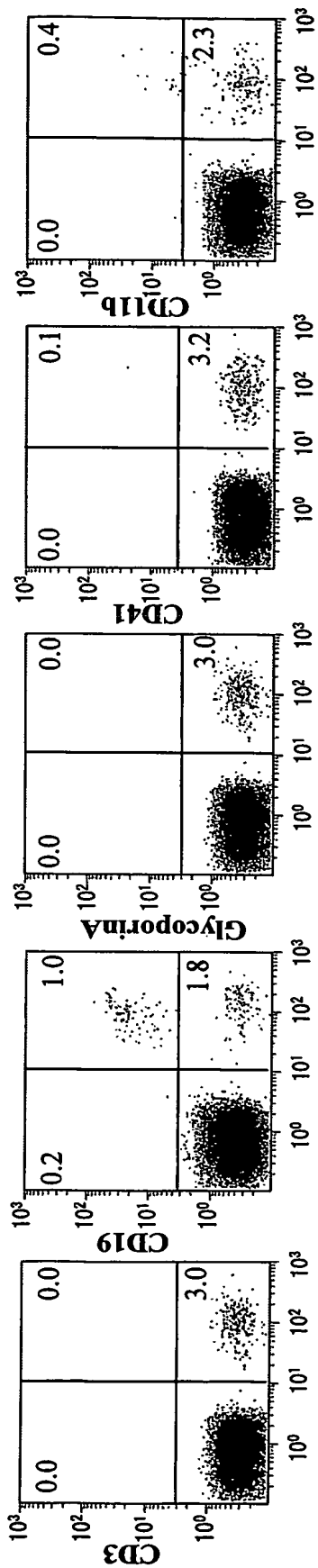
図6



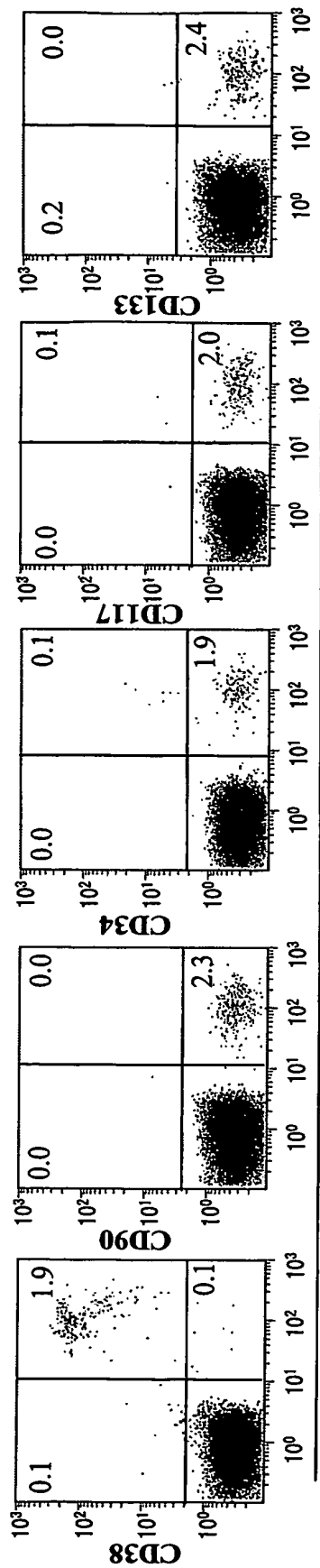


7

A



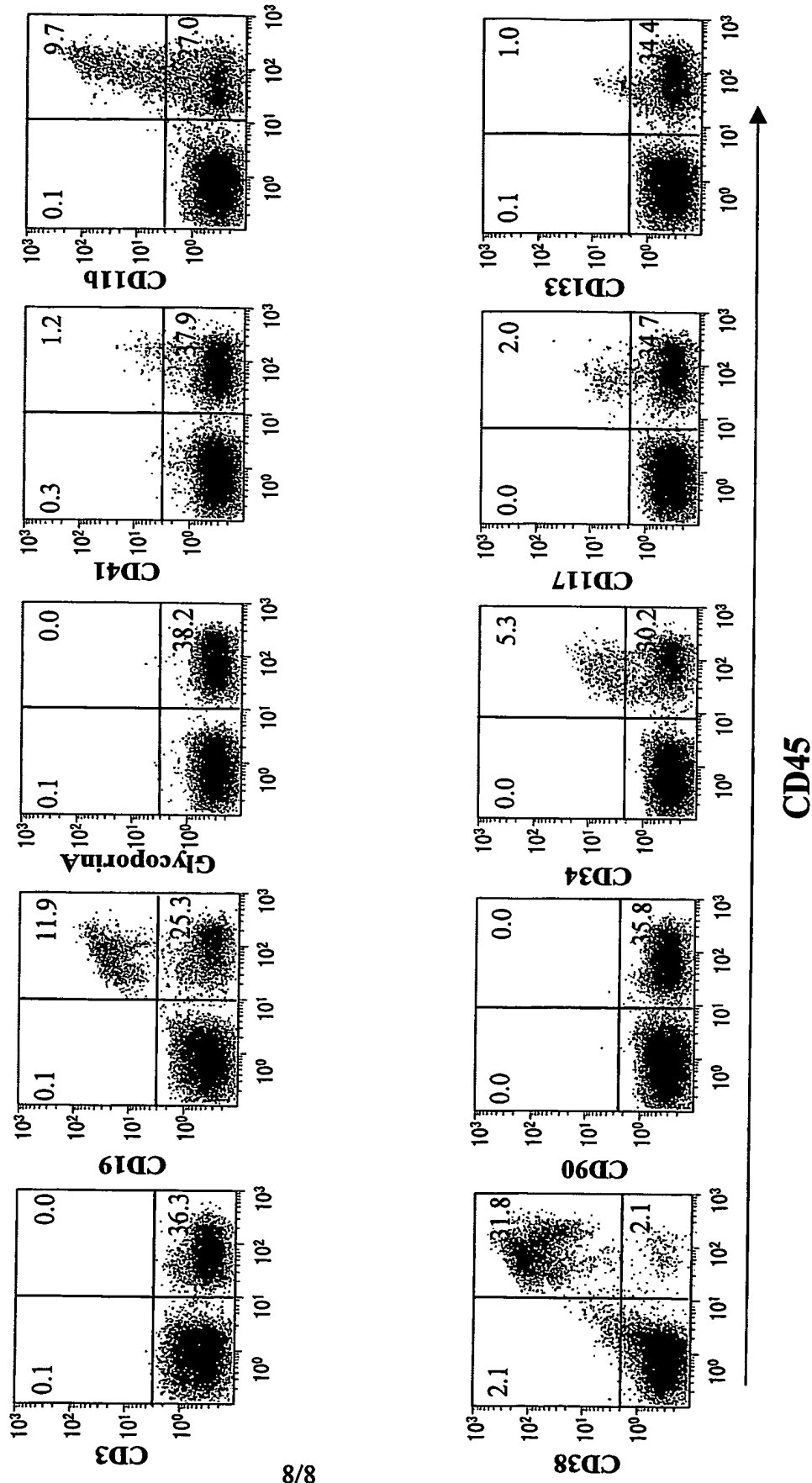
7/8



CD45

図 7

B



## SEQUENCE LISTING

<110> Renomedix Institute Inc.

<120> Method for increasing hematopoietic support ability of immortalized human stromal cells by introducing indian hedgehog gene

<130> PH-2100-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003/373173

<151> 2003-10-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 202

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Ala Arg Leu Arg Pro Arg Leu His Phe Cys Leu Val Leu

1

5

10

15

Leu Leu Leu Leu Val Val Pro Ala Ala Trp Gly Cys Gly Pro Gly Arg

20	25	30
Val Val Gly Ser Arg Arg Arg Pro Pro Arg Lys Leu Val Pro Leu Ala		
35	40	45
Tyr Lys Gln Phe Ser Pro Asn Val Pro Glu Lys Thr Leu Gly Ala Ser		
50	55	60
Gly Arg Tyr Glu Gly Lys Ile Ala Arg Ser Ser Glu Arg Phe Lys Glu		
65	70	75
Leu Thr Pro Asn Tyr Asn Pro Asp Ile Ile Phe Lys Asp Glu Glu Asn		
85	90	95
Thr Gly Ala Asp Arg Leu Met Thr Gln Arg Cys Lys Asp Arg Leu Asn		
100	105	110
Ser Leu Ala Ile Ser Val Met Asn Gln Trp Pro Gly Val Lys Leu Arg		
115	120	125
Val Thr Glu Gly Trp Asp Glu Asp Gly His His Ser Glu Glu Ser Leu		
130	135	140
His Tyr Glu Gly Arg Ala Val Asp Ile Thr Thr Ser Asp Arg Asp Arg		
145	150	155
Asn Lys Tyr Gly Leu Leu Ala Arg Leu Ala Val Glu Ala Gly Phe Asp		
165	170	175

Trp Val Tyr Tyr Glu Ser Lys Ala His Val His Cys Ser Val Lys Ser  
 180 185 190

Glu His Ser Ala Ala Ala Lys Thr Gly Gly  
 195 200

<210> 2

<211> 609

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtctcccg cccggctccg gccccgactg cacttctgcc tggctctgtt gctgctgctg 60  
 gtggtgccgg cggcatgggg ctgcggggccg ggtcgggtgg tgggcagccg ccggcgaccg 120  
 ccacgcaaac tcgtgccgct cgcctacaag cagttcagcc ccaatgtgcc cgagaagacc 180  
 ctgggcgcca gcggacgcta tgaaggcaag atcgctcgca gctccgagcg ctccaaggag 240  
 ctacccccca attacaatcc agacatcatc ttcaaggacg aggagaacac aggcgcccac 300  
 cgcctcatga ccagcgctg caaggaccgc ctgaactcgc tggctatctc ggtgatgaac 360  
 cagtggcccg gtgtgaagct gcgggtgacc gagggctggg acgaggacgg ccaccactca 420  
 gaggagtcct tgcattatga gggccgcgcg gtggacatca ccacatcaga ccgcgaccgc 480  
 aataagtatg gactgctggc gcgcttgga gtggaggccg gctttgactg ggtgtattac 540  
 gagtcaaagg ccacgtgca ttgctccgtc aagtcggagc actcggccgc agccaagacg 600  
 ggcggctaa 609

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003695

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K35/28, A61K38/00, A61K48/00, A61P7/06, C12N5/06, C12N5/10//C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, A61K35/28, A61K38/00, A61K48/00, A61P7/06, C12N5/06, C12N5/10//C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARON, M. et al., "induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals.", Differentiation. (2001), Vol.68, Nos.4 to 5, pages 175 to 185	1-13
Y	DYER, MA. et al., "Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo.", Development (2001), Vol.128, No.10, pages 1717 to 1730	1-13
Y	PATHI, S. et al., "Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog.", Mech Dev. (2001), Vol.106, Nos.1 to 2, pages 107 to 117	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June, 2004 (11.06.04)

Date of mailing of the international search report

29 June, 2004 (29.06.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/003695

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAWANO, Y. et al., "Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells.", Blood. (15 January, 2003 (15.01.03), Epub 05 September, 2002 (05.09.02)), Vol.101, No.2, pages 532 to 540	1-13
Y	Yojiro NIITSU et al., "Fushika Hito Kotsuzui Stroma Saibo o Mochiita CD34 Yosei Saibo kara no Sekigakyu Zofuku ni Kansuru Kento", Tokuhatsusei Zoketsu Shogai ni Kansuru Chosa Kenkyuhan Heisei 14 Nendo Sokatsu Buntan Kenkyu Hokokusho, 31 March, 2003 (31.03.03), pages 69 to 71	1-13
A	WO 99/20298 A1 (CURIS INC.), 29 April, 1999 (29.04.99), Full text & AU 9911089 A & EP 1028741 A1 & KR 2001031266 A & CN 1306436 A & JP 2001-520202 A & US 2002/0151460 A1 & DE 69821021 E	1-13
A	SIMONSEN, J.L. et al., "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells., Nat.Biotechnol., (2002), Vol.20, No.6, p.592-6	1-13

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, A61K 35/28, A61K 38/00, A61K 48/00, A61P 7/06, C12N 5/06, C12N 5/10//C07K 14/47

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, A61K 35/28, A61K 38/00, A61K 48/00, A61P 7/06, C12N 5/06, C12N 5/10//C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BARON, M. et al., Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. Differentiation. (2001) Vol. 68, No. 4-5, p. 175-185	1-13
Y	DYER, MA. et al., Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. Development (2001) Vol. 128, No. 10, p. 1717-1730	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 06. 2004

国際調査報告の発送日

29. 6. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

左海 匡子

4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) .. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	PATHI, S. et al., Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. Mech Dev. (2001)Vol.106, No.1-2, p.107-117	1-13
Y	KAWANO, Y. et al., Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. Blood. (2003.01.15, Epub 2002.09.05)Vol.101, No.2, p.532-540	1-13
Y	新津洋司郎他「不死化ヒト骨髓ストローマ細胞を用いたCD34陽性細胞からの赤芽球増幅に関する検討」 特発性造血障害に関する調査研究班 平成14年度総括・分担研究報告書(2003年3月31日)第69-71頁	1-13
A	WO 99/20298 A1(CURIS INC)1999.04.29, 全文 & AU 9911089 A & EP 1028741 A1 & KR 2001031266 A & CN 1306436 A & JP 2001-520202 A & US 2002/0151460 A1 & DE 69821021 E	1-13
A	SIMONSEN, J.L. et al., Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. Nat Biotechnol. (2002)Vol.20, No.6, p.592-6	1-13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**